

病原体検出マニュアル

風疹

第 5.0 版

令和4年(2022年)10月

目次

1. 風疹の概説
2. 検査に関する一般的注意
 - 2-1. 実験室、実験者
 - 2-2. 検査の進め方
 - 2-3. 風疹の検査材料、採取時期
 - 2-4. 検査材料の輸送と保管
 - 2-5. 検査の判定
 - 2-6. 感染症法届け出基準における検査の取り扱い
3. 遺伝子学的検査
 - 3-1. TaqMan プローブを用いたリアルタイム RT-PCR 法
 - 3-1-1. 主な試薬・機器
 - 3-1-2 風疹参照 RNA を用いた試験の最適化
 - 3-1-2-1 風疹参照 RNA の希釈
 - 3-1-2-2 反応液の調製
 - 3-1-2-3 リアルタイム RT-PCR 反応
 - 3-1-2-4 データ解析
 - 3-1-3 検査の実施
 - 3-1-3-1 ウイルス RNA 抽出
 - 3-1-3-2 風疹参照RNAの調製
 - 3-1-3-3 風疹ウイルスゲノムの検出
 - 3-1-3-4 試験成立条件
 - 3-1-3-5 判定
 - 3-1-3-6 トラブルへの対応
 - 3-2 コンベンショナル RT-nested PCR 法[非構造蛋白質(NS)遺伝子増幅法]
 - 3-2-1 Two-step 法による風疹ウイルス NS 遺伝子の検出
 - 3-2-1-1 試薬
 - 3-2-1-2 ウイルス RNA 抽出
 - 3-2-1-3. 逆転写反応(RT)

3-2-1-4. 1st PCR および nested PCR 反応

3-3. 風疹ウイルス E1 遺伝子の検出および遺伝子解析

3-3-1. 試薬

3-3-2. 1st PCR および nested PCR

3-3-3. PCR 産物の精製とダイレクトシーケンス反応

3-3-4. シーケンス結果の解析

3-4. リアルタイム RT-PCR およびコンベンショナル RT-PCR の陽性コントロール

4. ウイルス分離

4-1. 使用細胞

4-2. 分離方法

4-3. 同定方法

4-3-1. 蛍光抗体法

5. 検出ウイルスの命名法

6. 血清学的検査

6-1. 赤血球凝集抑制(Hemagglutination Inhibition: HI)抗体測定法

6-1-1. 試薬類

6-1-2. 血清処理

6-1-3. HA 抗原の定量

6-1-4. HI 本試験

6-1-5. 一般的な注意

6-1-6. 評価の目安

6-2. IgM 酵素免疫抗体測定 (IgM-EIA)

6-2-1. 評価の目安

6-3. IgG 酵素免疫抗体測定 (IgG-EIA)

6-3-1. 評価の目安

7. 引用文献

8. 検査依頼先

9. 改訂履歴

10. 執筆者

11. 附属資料

S3-2-1. Two-step法による風疹ウイルスNS遺伝子の検出(PerfectShot Ex-Taq使用例)

S3-2-2. One-step RT-PCR 法による風疹ウイルス NS 遺伝子の検出

S3-3. M13配列付加プライマーを用いた風疹ウイルスE1遺伝子の検出および遺伝子解析

1. 風疹の概説

風疹は *Matonaviridae* 科 *Rubivirus* 属のプラス鎖 RNA ウイルスである風疹ウイルスの飛沫感染によって引き起こされる急性感染症であり、感染後 2～3 週間の潜伏期間を経て発症する。発熱 (38~39℃)・発疹 (全身性の小紅斑や紅色丘疹)・リンパ節腫脹 (主に耳介後部、頸部および後頭部) が三主徴である。発熱・発疹は数日で消失するが、リンパ節腫脹は 3～6 週間持続する。成人では関節炎の症状もしばしば認められるが、ほとんどは一過性に終息する。稀に血小板減少性紫斑病や脳炎等の合併症を見ることもあるが、基本的に予後は良好な疾患である。また不顕性感染も小児で 30~50%、成人で 15%程度存在すると言われていたとともに、三主徴の全てが揃わない場合も多く、このような場合臨床診断は困難であり、検査診断が重要である。また、麻疹、溶血性連鎖球菌による発疹、伝染性紅斑、エンテロウイルス感染症等と鑑別診断が必要となることがあり、検査診断が有効である。

風疹に免疫の無い女性が妊娠初期 (特に 3 ヶ月以内) に風疹ウイルスに感染すると、その出生児に先天性風疹症候群 (Congenital Rubella Syndrome: CRS) を発症することがあり、大きな問題となる。CRS の 3 大症状は白内障、先天性心疾患、難聴であるが、その他網膜症、血小板減少、肝脾腫、身体および精神の発達遅延などを伴うこともある。CRS の検査・診断マニュアルは「先天性風疹症候群」の項に記す。

平成 26 年 4 月より「風しんに関する特定感染症予防指針」(以下、指針)が発効され、風疹の診断における検査の役割がより重要となった¹⁾。さらに平成 29 年 12 月に指針が改訂され、平成 30 年 1 月より原則として全例に検査診断が求められるようになった¹⁾。

2. 検査に関する一般的注意

2-1. 実験室、実験者

風疹ウイルスはクラス 2 の病原体に分類されているので、P2 実験施設で BSL2 の取り扱い基準に従って作業を行う。

風疹患者検体を扱う可能性の高い検査実施者は、事前に 2 回の風疹含有ワクチンの接種を受けるか、風疹抗体価を測定して十分な抗体価 [赤血球凝集抑制 (HI) 抗体価 32 倍以上] があることを確認してから検査に従事することが

強く推奨される²⁾。

2-2. 検査の進め方

風疹の検査として、血清学的方法および病原体検出法が利用可能である(表1)。血清学的方法としては、IgM抗体検出法、IgG抗体測定法およびHI抗体測定法などが利用可能であるが、急性期の血清を用いるIgM抗体検出法が一般的である。

病原体検出法としては、咽頭拭い液、血液、尿などを検体にしてウイルス分離およびウイルス遺伝子検出が可能である。ウイルス分離は分離同定までに時間がかかること、および分離可能な検体採取時期がウイルス遺伝子検出よりも短期間であること等から、まずはウイルス遺伝子検出法を行うことが一般的である。

2-3. 風疹の検査材料、採取時期

ウイルス分離およびウイルス遺伝子検出の検査材料として、麻疹と共通の臨床材料(咽頭拭い液、凝固防止末梢血液、尿)^{3,4)}が推奨される。風疹では鼻腔拭い液、血清、髄液も検査材料として使用可能である。風疹特異的抗体の検出には血清(または血漿)を用いる。検査方法は病原体検出法と血清学的診断法に分かれる。それぞれの検査には適切な検体、検体採取時期がある(表1)。

(表1)

	検査方法	検体	採取に適切な時期
病原体検出	コンベンショナルRT-PCR real-time PCR	咽頭拭い液、血液、血清、尿、 (鼻腔拭い液、髄液)	発症2-3日前から発症後1週間程度
	ウイルス分離		
血清学	IgM抗体検出 (IgM ELISA法)	血清	発症後4日～28日目

的 方 法	IgG 抗体価測 定 (IgG ELISA法等)、 HI抗体測定	血清 (ペア血清)	1回目:発症前～発症後4日目頃まで 2回目: 1回目の採血から2週間～4週 間後、発症後 2週間～4週間後
-------------	---	-----------	---

これらの検体の処理方法の例を挙げる。

- 1) 咽頭ぬぐい液または鼻腔拭い液 (ウイルス分離培養および遺伝子検査) :
合成樹脂素材のスワブ採取スティック (例: Sterile Swab Applicators, Copan 社製) で咽頭あるいは鼻腔粘膜をぬぐい、ウイルス保存輸送液 (1～3mL) に浸漬する。ウイルス保存輸送液は市販品 (例: BD ユニバーサルトランスポート検体輸送用培地、BD 社製) のほか、自家調整液*が使用できる**。検体は 3,000rpm, 20 分間遠心し、上清を検査に用いる。

* 0.5%ウシ血清アルブミンフラクション V (BSA)、ペニシリン G (100-500U/mL)、ストレプトマイシン (100-500µg/mL)、ゲンタマイシン (100µg/mL) およびアンフォテリシン B (2µg/mL) を添加した細胞培養用培地 (MEM 培地等) または PBS(-)を用いる。

** 上記を使用することが望ましいが、難しい場合には滅菌綿棒と少量の滅菌生理食塩水で代用することができる。細菌培養用のキャリー・ブレア培地等は望ましくない。

- 2) 凝固防止末梢血液 (ウイルス分離培養および遺伝子検査) :
クエン酸ナトリウムまたは EDTA 加末梢血液を用いる (2～5mL)。ヘパリン加末梢血液の場合は、RT-PCR 反応を阻害するため、ウイルス分離培養のみに供する。麻疹検査と同時に行う場合には、採血された凝固防止血液は以下のいずれかの処理操作を行い、末梢血単核球細胞 (PBMC) を分離して試験に供する。風疹検査のみの場合は、全血、血清、血漿を用いても良い。

[方法 1]

1. 凝固防止血液 2mL に等量の PBS を混和する。
2. あらかじめ Ficoll-paque (比重 1.077) (または同等品) 3mL を分注

した遠心チューブに 2 倍希釈した血液を静かに重層する。

3. 1,300×g、20 分間遠心する。
4. 表層から順に血漿（約 2 倍希釈）、末梢血単核球細胞（PBMC）、比重液および赤血球成分に分画される。PBMC はウイルス分離および遺伝子検査に供する。なお血漿はウイルス遺伝子検出及びウイルス分離ならびに一部の抗体価測定キットを用いた抗体価測定に使用できる。
5. 分画された PBMC は PBS で 3 回洗浄後、凍結保存液 [10%DMSO 加ウシ胎児血清（FBS）] に所定の濃度（ $2 \times 10^4 \sim 2 \times 10^6$ cells/ml）で調整し、 -80°C で凍結保存する。同様に血漿は -20°C （一部はウイルス分離用として -80°C ）に保存する。

[方法 2]

1. 凝固防止血液を 3,000rpm、20 分間遠心する。
2. 遠心された液の上層は血漿画分、下層は血球画分の 2 層に分画される。血球画分表層の白色を呈する細胞成分をゲルローディングチップ等により回収する。
3. 回収された細胞を元の量のウイルス輸送保存液または細胞維持用培養液に再浮遊して検体とする。
4. その他の画分は方法 1 に準じて保存する。

[方法 3]

1. 血液を室温で 1800rpm (400-800g)、20 分遠心する。
2. 血球成分が混入しないよう上清（血漿成分）を回収する。
3. 血球成分に採血量の 2 倍量となるように PBS を加える（採血量が 5ml ならば、10ml となるように PBS を加える）。
4. 遠心管に採血量と等量のリンパ球分離液 (Ficoll-Paque 等) を準備し、希釈した血球を静かに重層する。
5. スイングローターを用いて室温で 1800rpm (400-800g)、30 分間遠心する
6. PBS とリンパ球分離液の境界面に形成されたリンパ球層を回収する。
7. 回収したリンパ球に 2 倍量以上の PBS を加え、室温で 250-300g、10 分間遠心して洗浄する。この操作を計 3 回行う。血漿成分、リンパ球

を保存する。

3) 尿（ウイルス分離培養および遺伝子検査）：

10 から 50mL の尿を採取する。1,000～1,500rpm、10 分間遠心した沈渣細胞を 2～3mL のウイルス輸送保存液に再浮遊させたものを用いる。上記の処理を行うことが望ましいが、未処理尿検体でもウイルス遺伝子を検出可能である。上記の処理を行っても沈渣細胞が得られない場合があるが、その場合には尿検体をそのまま使用する。ウイルス分離に未処理尿検体を使用する場合、そのままだと細胞障害が起きることがあるため 2～10 倍に希釈して使用する。

4) 脳脊髄液（ウイルス分離培養および遺伝子検査、抗体価測定）：採取された検体をそのまま用いる。

5) 血清、血漿

（抗体価測定）：血液採取後、分離して使用する。

（ウイルス遺伝子検査）：検体から QIAamp Viral RNA mini kit（キアゲン社）等で RNA を抽出し使用する。

6) 全血（ウイルス遺伝子検査）：Nucleospin RNA Blood（タカラバイオ社）等を用いて 全血より RNA を抽出し使用する。

2-4. 検査材料の輸送と保管

検体を採取したら 4℃に保管し、速やかに検査実施施設へ冷蔵状態で輸送する。ウイルス遺伝子検出法あるいはウイルス分離法の実施は、採取後 48 時間以内に開始することが望ましいが、困難な場合にはそのまま冷蔵保存を行うか（採取後 7 日ぐらいまで）、-80℃でいったん冷凍保存する。全血からの血清・血漿・PBMC 分離および尿の遠心分離は冷凍前に実施する。検体の長期保存は必ず-80℃での冷凍で行うこと。血清学的検査に用いる血清は-20℃で保存可能である。

2-5. 検査の判定

次のいずれかあるいは複数の結果が得られた場合、風疹ウイルス感染陽性と判定する。

- 1) 風疹ウイルスが分離・同定される
- 2) 風疹ウイルス遺伝子が検出される。
- 3) 風疹ウイルス特異的 IgM が検出される。
- 4) ペア血清（急性期および回復期）において風疹ウイルス特異的 HI 抗体（あるいは IgG 抗体）の陽転、または HI 抗体価の 4 倍以上の上昇²⁾（あるいは IgG 抗体価の 2 倍以上の上昇⁵⁾）が認められる。

IgM 抗体の測定は非常に有用であるが、弱陽性の場合には必ずしも最近の風疹ウイルス感染を反映する訳ではないので注意が必要である。顕性感染の場合、発疹が出現してから遅くとも 4 日後には HI 抗体および IgM 抗体の上昇が見られる。逆に、発疹直後（0～3 日）の血清では場合によって陰性とすることがあるので、血清の採取時期には注意を要する。

2-6. 感染症法届け出基準における検査の取り扱い

風疹は感染症法における五類感染症のうち全数把握感染症に指定されており、全ての医療機関は風疹患者を診断した場合、届出を行うことが定められている。風疹の届出基準においては、「全身性の小紅斑や紅色丘疹」、「発熱」および「リンパ節腫脹」の 3 つすべての臨床症状を示した症例を臨床診断例とすると定められている。しかし、三徴候がすべてそろわない場合も多く、その場合は届出基準を満たすために検査が必要となる。

3. 遺伝子学的検査

本章では検体もしくは分離ウイルスからの風疹ウイルス遺伝子検出および遺伝子型解析法を記載する。

風疹ウイルス遺伝子の検査には、TaqManプローブを用いたリアルタイムRT-PCR法、またはコンベンショナルRT-nested PCR法〔非構造蛋白質（NS）遺伝子増幅法〕が利用できる。リアルタイムRT-PCR法は簡便性、迅速性にすぐれ、且つ実験室コンタミネーションのリスクが低減できることから、第一選択として推奨される。一方で、リアルタイムRT-PCR法はコンベンショナルRT-nested PCR法〔NS遺伝子増幅法〕と比較してやや感度が劣ることから、より厳密な判定が求められる場合には、コンベンショナルRT-nested PCR法を併用することが望ましい。

さらに風疹ウイルス陽性であった検体については、コンベンショナルRT-nested PCR法〔E1遺伝子増幅法〕で増幅した産物を用いて、遺伝子配列解析および遺伝子型決定を行うことが求められる¹⁾（図1）。

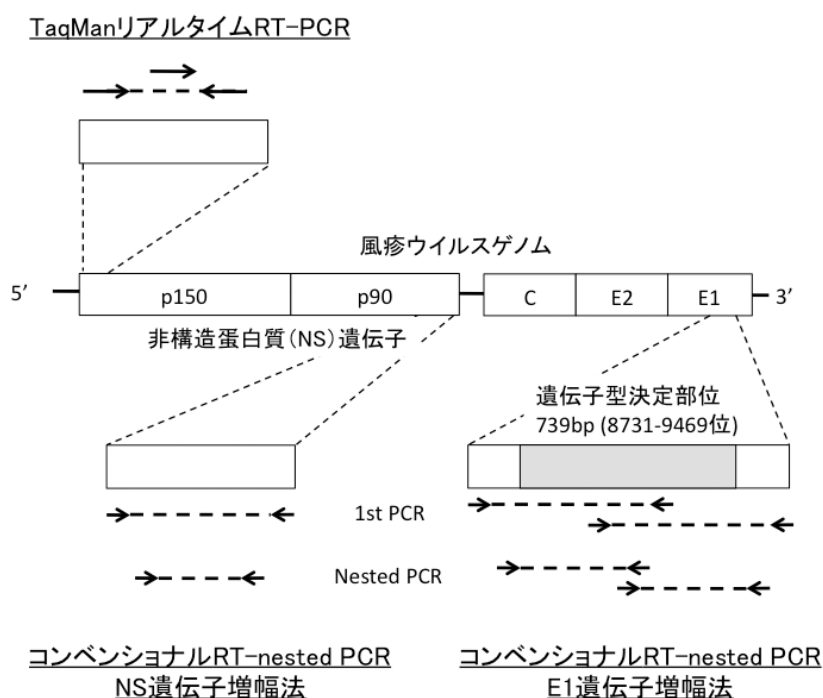


図1 風疹ウイルス RT-PCR 増幅部位

3-1. TaqMan プローブを用いたリアルタイム RT-PCR 法

逆転写反応および PCR 反応をシングルチューブで行う TaqMan プローブを用いた one-step リアルタイム RT-PCR 法を記載する。ここでは、例としてアプライドバイオシステムズ社の TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix および Applied Biosystems 7500 Fast リアルタイム PCR システムを用いた方法を示す。他の試薬および機器を用いる場合においても、以下の手順に準じて実施する。本 Real-time RT-PCR 法は、麻疹ウイルス Real-time RT-PCR 法⁴⁾と同じ反応条件（温度および反応時間）であることから、同一のプレートで並行して実施することが可能である。また、本法の変法である麻疹ウイルスと風疹ウイルスを同一ウェルで検出するためのマルチプレックス Real-time RT-PCR 法については、別途「病原体検出マニュアル<麻疹・風疹同時検査法>」に示す。

3-1-1. 主な試薬・機器

ウイルスRNA抽出キット（例: QIAamp Viral RNA mini kit；キアゲン社）

Real-time RT-PCR用マスターミックス（例: TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix；アプライドバイオシステムズ社）

マイクロピペット（各容量のもの）

フィルター付きピペットチップ（上記のマイクロピペットに対応したもの）

1.5ml エッペンドルフチューブ（核酸低吸着タイプ（例: DNA LoBind Tube 1.5mL；エッペンドルフ社）を推奨）

1.5ml エッペンドルフチューブ用高速冷却遠心機

96well reaction plate（例: Fast 96-well Reaction Plate (0.1mL)；アプライドバイオシステムズ社）

プレートシール（例: Optical Adhesive Covers；アプライドバイオシステムズ社）

遺伝子増幅装置（例: Applied Biosystems 7500 Fast リアルタイム PCR システム；アプライドバイオシステムズ社）

RNase free 水

プライマーおよび検出用プローブ

プライマー^{注1}

NS(32-54)Fwd: 5'- CCTAHYCCCATGGAGAAACTCCT -3' (10 μ M)

NS(143-160)Rev: 5'- AACATCGCGCACTTCCCA -3' (10 μ M)

注1：両プライマーのあらかじめミックス（各 10 μ M）したものを調整しても良い。その場合-20 $^{\circ}$ C保存し、凍結融解を数回以内に抑えて使用する。混合塩基 H は A, C, T（G 以外）, Y は C, T（pyrimidine 塩基）とする。

プローブ^{注2}

NS (93-106) Probe: 5' FAM-CCGTCGGCAGTTGG-MGB 3' (10 μ M)

注2：10 μ M に調製したものを RNase-free の滅菌チューブ等に分注し、凍結融解を数回以内に抑えて使用する。

陽性コントロール

・風疹参照 RNA ver.2（乾燥状態；12 μ l に溶かして 10⁷ コピー/ μ l）（RNA 保護剤として RNastable™(Biomatrix, Inc) 添加)^{注3}

注3：国立感染症研究所ウイルス第三部第二室より配布する。

3-1-2 風疹参照RNAを用いた試験の最適化

遺伝子増幅装置の機種やロットによって検出感度がわずかに異なることがあるので、初めて実施する際には以下の<3-1-2-1>～<3-1-2-4>を各施設において必ず行い、試験系を最適化する。また、定期的に（または必要に応じて）実施することにより、機器の感度チェックになる。

3-1-2-1 風疹参照 RNA の希釈

① 乾燥状態の参照 RNA に、12 μ l*の RNase free 水を加え、10⁷ コピー/ μ l の溶液を作製する。RNase free 水を加えた後、15 分間ほど室温に放置してから、泡立っていないようにマイクロピペットによるピペッティングまたは軽いタッピングを行い、溶解する。spin down して 4 $^{\circ}$ Cにおく。

② チューブ 7 本に 90 μ l の水（あるいは RNA 希釈用バッファー：例タカラバイオ EASY Dilution for Real Time PCR や carrier RNA**添加水）を分注し、「5 \times 10⁶」「5 \times 10⁵」「5 \times 10⁴」「5 \times 10³」「5 \times 10²」「5 \times 10¹」「5 \times 10⁰」とラベルする。

③ 10⁷ コピー/ μ l のスタンダード RNA 10 μ l を、「5 \times 10⁶」チューブに加え、

マイクロピペットによるピペッティングまたは軽いタッピングで攪拌し、spin down する (5×10^6 コピー/ $5 \mu\text{l}$ となる)。

④ 「 5×10^6 」チューブの $10 \mu\text{l}$ を「 5×10^5 」チューブに加え、軽く攪拌し spin down する。

⑤ ④と同様に、「 5×10^5 」から「 5×10^4 」、「 5×10^4 」から「 5×10^3 」と移していき、「 5×10^0 」までの 10 倍段階希釈を作製する。

⑥ 「 5×10^4 」は $20 \mu\text{l}$ ずつに分注後、 -70°C 以下で保存し、「風疹参照 RNA (5×10^4 コピー/ $5 \mu\text{l}$)」として、次回以降の最適化に用いる。

* : $120 \mu\text{L}$ の RNase free 水で溶解し、「 10^6 コピー/ μl 」の溶液を作製しても良い。その場合、②～⑤のステップで「 5×10^6 」チューブを除外し、「 5×10^5 」～「 5×10^0 」までの希釈段階を作製する。

** : 例 : Yeast RNA (Sigma R6750) を $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度で使用

3-1-2-2 反応液の調製

(以下、Applied Biosystems 7500 Fast リアルタイム PCR システムを使用の場合)

① プライマーミックス、プローブ、4×TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix を氷上で溶解し、混和しておく。

② 氷上にチューブを置き、以下に従って、7 ウェル分 (1 ウェル分過剰量) の反応液を調製する。

		1 反応あたり(μl)	7 反応合計(μl)	終濃度
RNase-Free water		5.9	41.3	
4 × TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix		5	35	1 ×
プライマー	NS(32-54)Fwd ($10 \mu\text{M}$)	1.8	12.6	900nM
	NS(143-160)Rev ($10 \mu\text{M}$)	1.8	12.6	900nM
NS (93-106) Probe ($10 \mu\text{M}$)		0.5	3.5	250nM
(8 ウェル)に分注		15		
サンプル RNA		5		
合計		20		

- ③ 96well reaction plate の 6 ウェルに、②のマスターミックスを 15 μ l ずつ分注する。
- ④ RNase-free 水および「**3-1-2-1 風疹参照 RNA の希釈**」で作製した風疹参照 RNA (「 5×10^4 」「 5×10^3 」「 5×10^2 」「 5×10^1 」「 5×10^0 」の 5 種類) を 5 μ l ずつ対応するウェルに加える。($5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^0$ コピー/反応となる)
- ⑤ プレートシールで封をした後、反応液を軽くスピンドウンする。

3-1-2-3 リアルタイム RT-PCR 反応

Applied Biosystems 7500 Fast リアルタイム PCR システムにセットし、以下の条件で反応を行う。

	設定
Assay	Absolute Quantification (Standard Curve)
Run Mode	Standard 7500
Reporter	FAM
Quencher	None ^{注5}

反応	条件	サイクル数
1. 逆転写反応	50°C 5分	1
2. 逆転写酵素不活化	95°C 20秒	1
3. PCR 反応	95°C 15秒	50
	60°C 1分	

注 5：風疹ウイルスゲノム検出用プローブは非蛍光クエンチャーを標識しているため、クエンチャーとして TAMRA を標識した麻疹ウイルス N 遺伝子検出用プローブ⁴⁾とは設定が異なる。Reporter および Quencher はウェル毎に設定できる。

3-1-2-4 データ解析

独立した3回の試験を実施し、以下の4つの基準を満たしていることを確認する。

- ① 段階希釈した風疹参照RNAで作製した検量線のslopeが-3.1から-3.8の間であること。(1サイクルで2倍のDNA断片に増幅する理想的なPCR 反応の場合、slopeは-3.32になる。)

② 段階希釈した風疹参照 RNA で作製した検量線の R^2 値が 0.98 以上であること。

③ 5×10^1 コピー/反応の風疹参照 RNA が $Ct \leq 40$ で検出されること。

④ 陰性コントロールである水が陰性 ($Ct > 40$) であること。

ただし、検量線は $Ct = 40$ 以内で検出できた希釈までで作製する (通常、 $5 \times 10^1 \sim 5 \times 10^0$ コピー/反応)。

これらの条件を安定して満たさない場合は、機器の校正、試薬類の再調整などを検討する。

3-1-3 検査の実施

3-1-3-1 ウイルスRNA抽出

ウイルスRNA (vRNA) の抽出は、キット添付文書に準じて行う。

同時に水を検体としてRNA抽出を行い、RNA抽出の陰性コントロールとして使用する。

抽出RNAは、 -70°C 以下で保存する。

3-1-3-2 風疹参照RNAの調製

5×10^1 および 5×10^0 コピー/反応の参照RNA希釈液二点を陽性コントロールとして使用する。各施設の状況に応じて濃度を変更できるが、 5×10^1 コピー/反応以下の濃度の陽性コントロールを必ず設定すること。定量等のため、 5×10^1 コピー/反応を超える高濃度参照RNAを使用する場合には、コンタミネーションに注意する。コンタミネーションを避けるため、高濃度の風疹参照RNAを取り扱う作業は、試験と別の場所で行う。

3-1-3-3 風疹ウイルスゲノムの検出

下表に基づいて必要な試薬量を計算する。検体以外に必要なサンプルは、①陰性コントロール (水)、②RNA 抽出の陰性コントロール (水を検体としてRNA 抽出したもの)、③陽性コントロール二点 (原則として 5×10^1 および 5×10^0 コピー/反応の風疹参照 RNA) の 4 つである。反応液の調整および反応条件は<3-1-2-3 リアルタイム RT-PCR 反応>と同様に行うが、判定には $Ct = 40$ までしか使用しないので、PCR 反応サイクル数は 40~50 の範囲で変更が可能とする。

		1 反応あたり(μl)
RNase-Free water		5.9
4 × TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix		5
プライマー	NS(32-54)Fwd (10μM)	1.8
	NS(143-160)Rev (10μM)	1.8
NS (93-106) Probe (10μM)		0.5
サンプル RNA		5
合計		20

反応	条件	サイクル数
1. 逆転写反応	50°C 5分	1
2. 逆転写酵素不活化	95°C 20秒	1
3. PCR 反応	95°C 15秒	40~50
	60°C 1分	

3-1-3-4 試験成立条件

陰性コントロール（水、水を検体として RNA 抽出したもの）が陰性（反応無しあるいは Ct 値>40）であり、陽性コントロール（ 5×10^1 コピー/反応）が Ct ≤ 40 となった場合に試験が成立する。

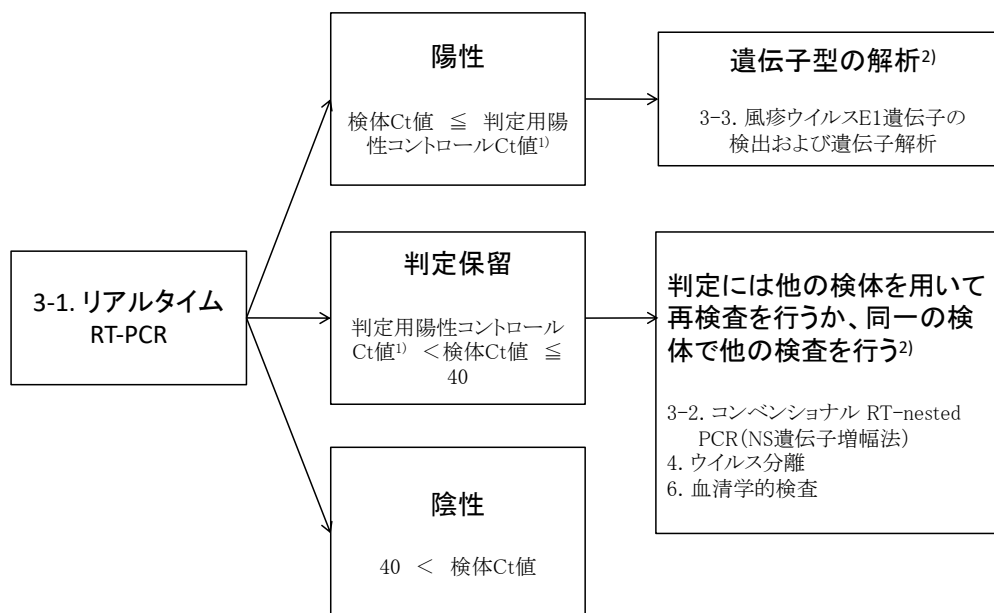
3-1-3-5 判定

陽性コントロールとして用いた 5×10^1 および 5×10^0 コピー/反応の参照 RNA 希釈液二点のうち、 5×10^0 コピー/反応が Ct ≤ 40 の場合は 5×10^0 コピー/反応を、 5×10^0 コピー/反応が Ct >40 の場合は 5×10^1 コピー/反応を判定用陽性コントロールとして使用する。

検体の Ct 値が判定用陽性コントロールの Ct 値以下の場合に「陽性」、判定用陽性コントロールの Ct 値より大きく且つ Ct 値が 40 以下の場合に「判定保留」、Ct 値が 40 より大きい場合に「陰性」と判断する（図 2）。

「陽性」と判定された場合、<3-3 風疹ウイルス E1 遺伝子の検出および遺伝子解析>に準じて、可能な限り風疹ウイルスの遺伝子解析を実施することが求められる。 「判定保留」の場合には、必要に応じて、他の適切な検体を用いて再検査を行うか、または同一の検体で 3-2 コンベンショナル RT-nested

PCR (NS 遺伝子増幅法)、4.ウイルス分離、6.血清学的検査などを用いて判定を行うと良い。



- 1) Ct値40以下を示した最大希釈の参照RNAのCt値
- 2) 可能な限り実施

図2 リアルタイム RT-PCR の判定フローチャート

3-1-3-6 トラブルへの対応

試験を行った結果、陽性コントロールが検出できない等の問題が認められた場合は、分注した別のコントロールを使用する等、適切に対応する。試験系に問題が認められた場合は<3-1-2 風疹参照 RNA を用いた試験の最適化>を参照して試験系の再評価を行う。

3-2. コンベンショナル RT-nested PCR 法[非構造蛋白質(NS)遺伝子増幅法]

本マニュアルでは、例として RT 反応と 1st PCR を分けて行う方法 (Two-step 法) を記載する。風疹ウイルスゲノムは GC 含量が非常に高い (約 70%) ため、高 GC 含量鋳型増幅に対応した逆転写反応試薬および PCR 試薬 (タカラバイオ社 Tks Gflex DNA polymerase 等) を使用することが望ましい。第 3 版に記載していた One-Step 法ならびに麻疹診断マニュアル⁴⁾に記載された酵素 PerfectShot Ex-Taq を用いる方法は<11. 附属資料>に記載する。

3-2-1. Two-step 法による風疹ウイルス NS 遺伝子の検出

3-2-1-1. 試薬

- RNA 抽出キット：一般的な RNA 抽出キットおよびウイルス RNA 抽出キット (例: QIAamp Viral RNA mini kit; キアゲン社や High Pure Viral RNA kit; ロシュアプライドサイエンス社) を用いることができる。
- 逆転写酵素 [例: PrimeScript RT reagent kit (PerfectReal time); タカラバイオ社]
- PCR 酵素 [例: Tks Gflex DNA polymerase; タカラバイオ社]
- NS 遺伝子増幅用プライマー

用途	プライマー名	認識領域 (bp)	方向*	配列
1st PCR	NSL F3	5746-5762	F	TCC TTG CGC CGA AGA CT
	NSL B3-6	5984-6001	R	AGA GGG GGT CCA CTT GAG
Nested PCR	F2 nest	5811-5829	F	CCA CTG AGA CCG GCT GCG A
	B2 nest	5948-5967	R	GCC TCG GGG AGG AAG ATG AC

* F : Forward primer、 R : Reverse primer

- アガロースゲル (1.5~2.0%)
- DNA 分子量マーカー (例: 100bp DNA Ladder)

3-2-1-2. ウイルス RNA 抽出

RNA 抽出はリアルタイム RT-PCR 法と同様に行う (3-1-3-1 ウイルス RNA 抽出に準じる)。

3-2-1-3. 逆転写反応(RT)

ここでは、反応に必要な試薬がキットの中にすべて含まれる PrimeScript RT reagent kit (Perfect Real Time) (タカラバイオ社製) を用いた方法を記載する。

前項 (3-2-1-2) で抽出した RNA 溶液 10 μ L, 5 \times PrimeScript Buffer 4 μ L, PrimeScript RT Enzyme Mix I 1 μ L, Random 6mers 4 μ L, RNase Free dH₂O 1 μ L を添加して総量 20 μ L にした後、37 $^{\circ}$ C15 分、85 $^{\circ}$ C5 秒のインキュベーションにより cDNA 合成と逆転写酵素の不活化を行う。

RT により合成された cDNA を用い、NS 遺伝子の検出を行う。

RNA	10 μ L
5 \times PrimeScript Buffer	4 μ L
PrimeScript RT Enzyme Mix I	1 μ L
Random 6mers (100 μ M)	4 μ L
RNase Free dH ₂ O	1 μ L
合計	20 μ L

3-2-1-4. 1st PCR および nested PCR 反応

1) 以下の試薬およびプライマーセットを混合し、PCR 反応を行う。

2 \times Tks Gflex buffer (Mg ²⁺ , dNTP plus)	12.5 μ L
cDNA	2.5 μ L
Forward primer: NSL F3 (20 μ M)	0.25 μ L
Reverse primer: NSL B3-6 (20 μ M)	0.25 μ L
Tks Gflex DNA polymerase (1.25 units/ μ L)	0.5 μ L
DNase/RNase free water	9 μ L
合計	25 μ L

反応	条件	サイクル数
1. Denaturation	98 $^{\circ}$ C 1 分	1
2. PCR 反応	Denaturation	30
	Annealing	
	Extension	

3. 最終 Extension	72°C 5分	1
-----------------	---------	---

2) 以下の試薬を混合し、nested PCR 反応を行う。

2×Tks Gflex buffer (Mg2+, dNTP plus)	12.5μL
1st PCR 産物	2.5μL
Forward primer: F2 nest (20μM)	0.25μL
Reverse primer: B2 nest (20μM)	0.25μL
Tks Gflex DNA polymerase (1.25 units/μL)	0.5μL
DNase/RNase free water	9μL
合計	25μL

反応	条件	サイクル数
1. Denaturation	98°C 1分	1
2. PCR 反応	Denaturation	30
	Annealing	
	Extension	
3. 最終 Extension	72°C 5分	1

3) 電気泳動

PCR 産物 10μL を適切な loading buffer と混合したのち、1.5~2.0%アガロースゲル (TAE buffer 使用) を用い、Mupid ミニゲル泳動槽等で 10μL の PCR 産物を泳動する。DNA 検出用蛍光試薬による染色後、トランスイルミネーターで蛍光検出する。風疹ウイルス遺伝子が存在した場合、1st PCR の増幅産物として 256bp、nested PCR の増幅産物として 157bp のバンドが認められる。

3-3. 風疹ウイルス E1 遺伝子の検出および遺伝子解析

世界保健機関 (WHO) によって、風疹ウイルスの遺伝子型分類は、E1 遺伝子内の sequence window 領域 (739bp、8731-9469 位) の遺伝子配列を参照株の遺伝子配列と比較解析することで行うことが定められている⁶⁾。臨床検体中のウイルスから sequence window 領域全長を一度に増幅させることが困難であることが多いため、二断片に分けて RT-nested PCR で増幅させた

のち、遺伝子配列解析に用いる。ときにリアルタイム RT-PCR やコンベンショナル RT-PCR で NS 遺伝子の検出が可能であった場合でも、E1 遺伝子の片方の断片あるいは両断片が増幅できないことがある。その場合、検体中のウイルス遺伝子量が少ないことが考えられるため、ウイルス分離を行った後、分離サンプルを用いて E1 遺伝子の検出および遺伝子解析を行うと良い。

また、プライマー配列に改良を加えた変法を、〈11. 附属資料〉「3-3-5. M13配列付加プライマーを用いた風疹ウイルスE1遺伝子の検出および遺伝子解析」に記載する。

3-3-1. 試薬

<3-2. コンベンショナル RT-nested PCR 法[非構造蛋白質(NS)遺伝子増幅法]>で使用する試薬を使用する(〈3-2-1-1 試薬〉を参照のこと)。特に PCR 酵素は Tks Gflex DNA polymerase (タカラバイオ社) 等の高 GC 含量対応酵素を用いることが望ましい(11. 附属資料<3-2-2>の One-Step RT-PCR 法で用いる試薬は十分な感度が得られないため、本法には適さない)。この他、以下の試薬を用いる。

- E1 遺伝子増幅用プライマー

5'断片 E1-(2)

用途	プライマー名	認識領域 (bp)	配列
1st PCR	E1-2F	8633-8652	AGC GAC GCG GCC TGC TGG GG
	E1-2R*1	9119-9138	CCA GCG CGT ATG TGG AGT CC
Nested PCR およびシーク エンシング	E1-6F	8664-8683	ACA CCG TGA TGA GCG TGT TC
	E1-10R*2	9110-9129	ATG TGG AGT CCG CAC TTG CG

*1: E1-2R の代わりに E1-2Rmix が使用可能である。

E1-2Rmix: CCR GCG CGT ATG TGG AGY CC

*2: E1-10R の代わりに E1-10Rmix が使用可能である。

E1-10Rmix: ATG TGG AGY CCG CAC TTS CG

(混合塩基 R: A/G, Y: T/C, S: G/C)

3'断片 E1-(3)

用途	プライマー名	認識領域 (bp)	配列
1st PCR	E1-7F	8991-9010	TTG TGG GGG CCA CGC CAG AG
	E1-12R	9521-9540	TGT GTG CCA TAC ACC ACG CC
Nested PCR およびシーク エンシング	E1-3F	9070-9089	CGG CGA GGT GTG GGT CAC GC
	E1-3R	9473-9492	ACC CGC GCG CTC GCG CGA TC
シークエンシ ング	E1-3R'seq ¹⁾	9473-9492	ACC CGC GCG CTC aCa CGA TC
	E1-S4R ²⁾	9405-9422	CGG CGG TGA CGA ACT TCC

1) シークエンシング時にプライマーE1-3Rの代わりに用いる。配列中の2つの小文字aがプライマーE1-3Rと異なる。Nested PCRには用いないこと。

2) 3'断片E1-(3)がプライマーE1-3FおよびE1-3R(もしくはE1-3R'seq)を用いて解読できない場合に補助的に使用する。

- PCR産物精製キット(例: QIAquick PCR Purification Kit; キアゲン社)
- DNAゲル抽出キット(例: QIAquick Gel Extraction Kit; キアゲン社)
- シークエンシングキット(例: BigDye® Terminators Cycle Sequencing Kit; アプライドバイオシステムズ社)

3-3-2. 1st PCR および nested PCR

3-2-1-3.で調製したcDNAを用いる。Tks Gflex DNA polymerase (タカラバイオ社)を使用した例を示す。

1) PCR 反応

2×Tks Gflex buffer (Mg ²⁺ , dNTP plus)			12.5μL
cDNA			2.5μL
	5'断片 E1-(2)	3'断片 E1-(3)	
Forward primer (20μM)	E1-2F	E1-7F	0.25μL
Reverse primer (20μM)	E1-2R	E1-12R	0.25μL
Tks Gflex DNA polymerase (1.25 units/μL)			0.5μL
DNase/RNase free water			9μL
合計			25μL

反応	条件	サイクル数
1. Denaturation	98°C 1分	1
2. PCR 反応	Denaturation	98°C 10秒
	Annealing	61°C 15秒
	Extension	68°C 30秒
3. 最終 Extension	72°C 5分	1

2) 以下の試薬を混合し、nested PCR 反応を行う。

2×Tks Gflex buffer (Mg ²⁺ , dNTP plus)			12.5μL
cDNA			2.5μL
	5'断片 E1-(2)	3'断片 E1-(3)	
Forward primer (20μM)	E1-6F	E1-3F	0.25μL
Reverse primer (20μM)	E1-10R	E1-3R	0.25μL
Tks Gflex DNA polymerase (1.25 units/μL)			0.5μL
DNase/RNase free water			9μL
合計			25μL

反応	条件	サイクル数
1. Denaturation	98°C 1分	1
2. PCR 反応	Denaturation	98°C 10秒
	Annealing	E1-(2): 59°C 15秒 E1-(3): 66°C 15秒
	Extension	68°C 30秒
3. 最終 Extension	72°C 5分	1

3) 電気泳動

1.5~2.0%アガロースゲル (TAE buffer 使用) を用い、Mupid ミニゲル泳動槽等で 10μL の PCR 産物を泳動する。DNA 検出用蛍光試薬による染色後、トランスイルミネーターで蛍光検出する。1st PCR の増幅産物は 5'断片 E1-(2) で 506bp, 3'断片 E1-(3) で 551bp のバンドとして認められる。一方、nested PCR の増幅産物は 5'断片 E1-(2) で 466bp, 3'断片 E1-(3) で 423bp とのバンドとして認められる。

3-3-3. PCR 産物の精製とダイレクトシーケンス反応

1) PCR 産物の精製

PCR 産物が電気泳動で確認できたならば、PCR 産物の精製を行う。単一バンドとして認められた場合には市販の PCR 産物精製キットを用いると簡便である。バンドが複数認められた場合には、ゲルから目的のバンドのみを切り出して精製する。シーケンスプライマーは、通常 nested PCR に使用したプライマーを使用することが出来る（すなわち、5'断片 E1-(2)の場合、E1-6F または E1-10R、3'断片 E1-(3)の場合、E1-3F または E1-3R）（図 3）。ただし、プライマー E1-3R を用いたダイレクトシーケンス反応では、波形がきれいに出ず、十分なデータを得られないことがあるため、プライマー E1-3R の代わりに E1-3R'seq: ACC CGC GCG CTC aCa CGATC（a は E1-3R との相違部分）を使用すると波形データの改善が認められることがある。プライマー E1-S4R: CGG CGG TGA CGA ACT TCC（9405-9422 塩基領域に対応）は、E1-3R もしくは E1-3R'seq によって 3'断片 E1-(3)の 5'末端付近の配列が決定できなかった場合等に補助的に使用する。

2) シーケンス反応

以下の試薬およびプライマーを混合し、サイクルシーケンス反応を行う。

H ₂ O	10μL
Primer (3.2μM)*	1μL
BigDye Terminator Ready Reaction Mix	8μL**
精製 PCR 産物 (5-20ng/μL)	1μL

*Primer: 5'断片 E1-(2)の場合、E1-6F または E1-10R、3'断片 E1-(3)の場合、E1-3F または E1-3R（もしくは E1-3R'seq、E1-S4R）を用いる。

**BigDye Terminator Ready Reaction Mix は 5×BigDye sequencing buffer で希釈可能であるが、至適希釈率は各自で検討を行う必要がある。

反応条件	サイクル数
96°C 1分	1
96°C 10秒	25

50°C 5 秒	
60°C 4 分	

3) シークエンス反応産物精製およびシークエンス解析

BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit のプロトコールに従い、スピнкаラム法やエタノール沈殿法等を用いて、未反応ダイターミネーターを除去する。プライマーE1-3R（もしくは E1-3R'seq）を用いた反応産物をシークエンス解析する場合、特に精製方法の影響を受けやすい。感染研では Gel Filtration Cartridge（EdgeBio）を用いた方法もしくはエタノール沈殿で精製を行ない、良好な結果を得ている。この精製産物を DNA シークエンサーにより解析し、遺伝子配列の決定を行う。

3-3-4. シークエンス結果の解析

5'断片および 3'断片の遺伝子配列情報をつなぎ合わせて、739bp からなる遺伝子型決定領域（8731-9469 位）の配列情報を構築する（図 3）。

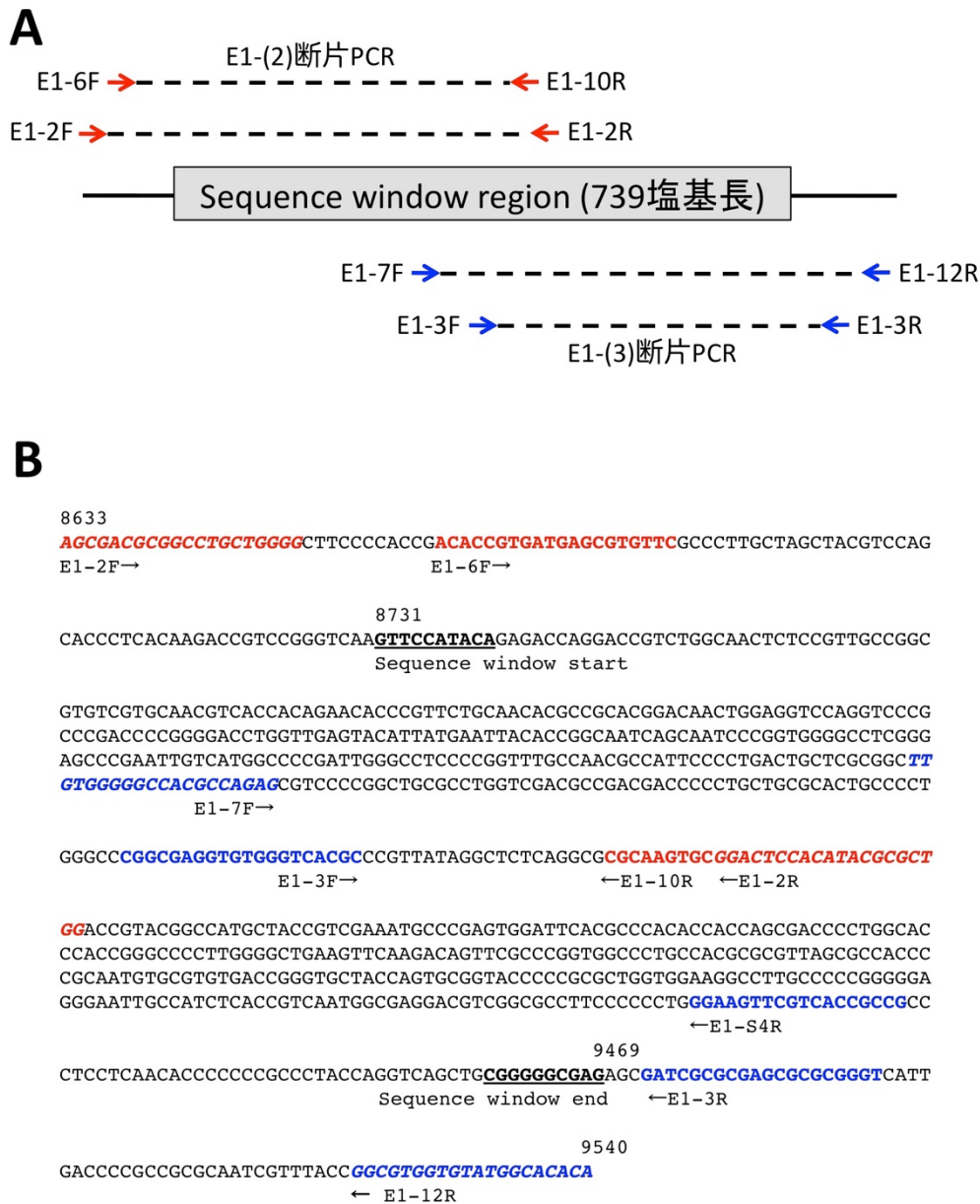


図3 遺伝子型決定領域 (sequence window) 周辺の cDNA 配列

(A) 遺伝子型決定領域増幅用プライマーの認識部位の模式図、(B) TO-336.GMK5 株 (TO-336 ワクチン株の親株、遺伝子型 1a、accession number: AB588192) の配列を示す。E1-(2)断片および E1-(3)断片増幅プライマー結合部位を、それぞれ赤および青字で示す。遺伝子型決定領域の最初と最後の 10 塩基ずつを黒太字で示す。

現在 WHO が中心となって、各国の実験室から報告された風疹ウイルス遺

伝子情報をもとに遺伝子型分類が行われている⁸⁾。現在のところ風疹ウイルスは2つの Clade に大きく分けられることが判明している。さらに Clade 1 には10つの遺伝子型(1a, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1G, 1H, 1I, 1J)が、Clade 2 には3つの遺伝子型(2A, 2B, 2C)が存在する。アルファベットの小文字で表記された遺伝子型は仮(provisional)の遺伝子型である。WHO によって定められたそれぞれの遺伝子型の参照株の配列(表2)とあわせて分子系統樹解析を行うことにより、検出されたウイルスがどの遺伝子型に分類されるのかが判定できる(図4)。近年、遺伝子型1aウイルスはワクチンウイルスを除いてほとんど検出されていない。このため本遺伝子型ウイルスが検出された場合にはワクチン株である可能性が高く、認められる症状はワクチン接種の副反応が疑われる。ワクチン接種の副反応の場合には風疹とは診断しない。また世界各国から報告された配列データを用いて分子疫学的な解析が行え、検出されたウイルスによる感染が輸入例か否かを判別することなどが可能となる。

2013年の風疹命名法の改定⁸⁾では、これまで仮遺伝子型であった1H, 1I, 1Jが正式な遺伝子型に昇格した。加えて一部の参照株の更新(1Hの一株)および名称の整理がなされた(表2)。

E1 遺伝子解析がなされた場合、遺伝子型情報に加え、遺伝子配列についても NESID 病原体検出情報システムに登録を行う。風疹ウイルス遺伝子が検出されたものの、E1 遺伝子解析が出来なかった場合には、型別不明(not typed)として NESID 病原体検出情報システムに登録を行う。遺伝子型1aのワクチン株が検出された場合の NESID 病原体検出情報システムへの登録は任意である。

また、可能な限り DDBJ 等の遺伝子データバンクへの登録も行うことが推奨される(ワクチン株が検出された場合をのぞく)。

表2 風疹ウイルス各遺伝子型の参照株

遺伝子型	参照株の新名称	参照株の前名称 (本マニュアル第二版記載)	Accession Number
1a	RVi/Brussels.BEL/0.63/(VAC)	RVi/BEL/63[1a]VAC	AF188704
	RVi/New Jersey.USA/0.61/(VAC)	RVi/NJ.USA/61[1a]VAC	M30776
	RVi/Pennsylvania.USA/0.64/(VAC)	RVi/PA.USA/64[1a]VAC	L78917
	RVi/Toyama.JPN/0.67/	Rvi/Toyama.JPN/67[1a]	AB047330
1B	RVi/Jerusalem.ISR/0.75/	RVi/Jerusalem.ISR/75[1B]	AY968207
	RVi/Tiberias.ISR/0.88/	RVi/Tiberias.ISR/88[1B]	AY968209
	RVi/Bene Berak.ISR/0.79/	RVi/BeneBerak.ISR/79[1B]	AY968208
1C	RVi/California.USA/0.91/	RVi/Los Angeles.CA.USA/91[1C]	AY968212
	RVi/San Salvador.SLV/0.02/	RVi/SLV/02[1C]	AY968211
	RVi/Panama City.PAN/0.99/	RVi/PAN/99[1C]	AY968217
1D	RVi/Tokyo.JPN/0.90/	Rvi/Tokyo.JPN/90CRS[1D]	AY968214
	RVi/Saitama.JPN/0.94/	Rvi/Saitama.JPN/94[1D]	AY968216
1E	RVi/Shandong.CHN/0.02/	RVi/Dezhou.CHN/02[1E]	AY968210
	RVi/Kuala Lumpur.MYS/0.01/	RVi/MYS/01[1E]	AY968221
1F	RVi/Shandong.CHN/0.00/	Rvi/Linqing.CHN/00[1F]	AY968213
	RVi/Anhui.CHN/0.00/	RVi/Dangshan.CHN/00[1F]	AY968215
1G	RVi/Kampala.UGA/20.01/	Rvi/UGA/20.01[1G]	EF588978
	RVi/Ontario.CAN/27.05/	Rvi/Ontario.CAN/27.05[1G]	EF588970
	RVi/Minsk.BLR/29.04/	RVi/Minsk.BLR/29.04[1G]	AM258945
1H	RVi/Minsk.BLR/28.05/2	Rvi/Minsk.BLR/28.05[1H]	AM258953
	RVi/Ryazan.RUS/09.08/		HG326276
		Rvi/Novokuznetsk.RUS/04[1H]	EF421977
1I	RVi/Milan.ITA/46.92/	Rvi/Milan.ITA/46.92[1I]	AY161360
	RVi/London.GBR/0.86/	Rvi/London.GBR/86[1I]	AF039122
1J	RVi/Kagoshima.JPN/22.04/	Rvi/Kagoshima.JPN/22.04[1J]	AB285129
	RVi/Miyazaki.JPN/10.01/	Rvi/Miyazaki.JPN/10.01[1J]CRS	AB285130
2A	RVi/Beijing.CHN/0.79/	RVi/Beijing.CHN/79[2A]	AY258322
	RVi/Beijing.CHN/0.80/(VAC)	RVi/Beijing.CHN/80[2A]VAC	AY258323
2B	RVi/TelAviv.ISR/0.68/	RVi/TelAviv.ISR/68[2B]	AY968219

	RVi/Washington.USA/16.00/	Rvi/Seattle.WA.USA/16.00[2B]	AY968220
	RVi/Anhui.CHN/0.00/2	RVi/Anqing.CHN/00/2[2B]	AY968218
2C	RVi/Moscow.RUS/0.67/	Rvi/Moscow.RUS/67[2C]	DQ388279
	RVi/Moscow.RUS/0.97/	Rvi/Moscow.RUS/97[2C]	DQ085340

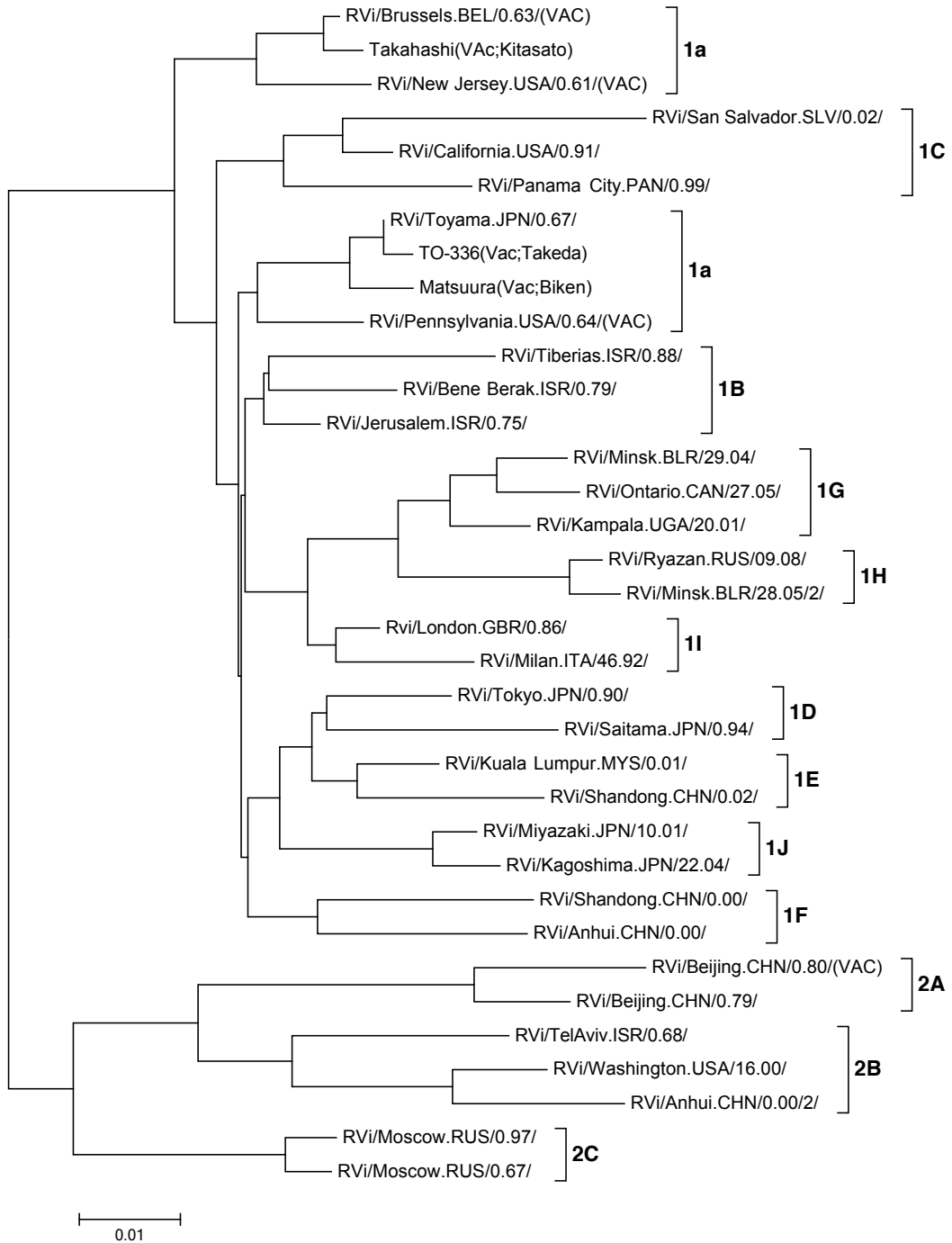


図4 風疹ウイルス参照株および日本のワクチン株による系統樹

E1 遺伝子の遺伝子型決定領域（739bp）の配列情報を用いて近隣接合法によって解析を行った。現在 13 種の遺伝子型に分類されている。日本のワクチン株（TO-336 株、松浦株、高橋株）および全世界で主に使用されるワクチン株（RVi/Pennsylvania.USA/0.64/(Vac), 別名 RA27/3 株）は遺伝子型 1a に分類される。

3-4. リアルタイム RT-PCR およびコンベンショナル RT-PCR の陽性コントロール

上記 RT-PCR に使用する陽性コントロールは国立感染症研究所ウイルス第三部第二室から配布している。令和元年 7 月現在の参照 RNA (ver.2) ではコンベンショナル RT-PCR（NS、E1 遺伝子増幅法）の増幅部位に外来配列が挿入されており、参照 RNA と野外ウイルス株由来の PCR 産物は、電気泳動を行うことでその増幅サイズで判別が可能になっている（図5）。参照品使用の詳細は、配布時に添付される説明書を参照すること。

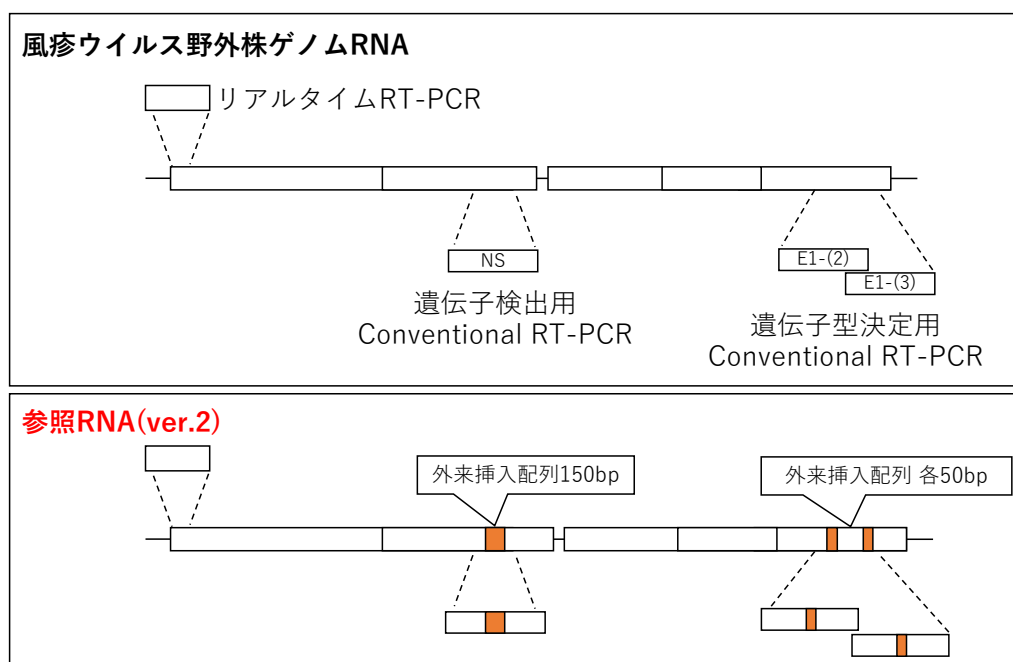


図5 風疹ウイルス参照 RNA (ver.2) における外来配列の挿入部位の模式図

4. ウイルス分離

ウイルスの分離および同定には 3～4 週間を要する。

4-1. 使用細胞

多くの細胞が風疹ウイルス感受性であるが、Vero、VeroE6 および RK-13 細胞が国内外での実績が多い。なお、臨床症状等より麻疹ウイルス感染と区別が困難な場合は、麻疹ウイルスの分離方法に則し、ヒト SLAM 発現 Vero 細胞を用いて分離を行うことも可能である。また、風疹ウイルスの増殖は抗真菌剤のファンギソンによって抑制されるので、ウイルス分離のための培養液には加えない方がよい⁹⁾。

4-2. 分離方法

以下は国立感染症研究所で実施している方法（RK-13 細胞使用）をもとに記載するが、細胞種による差や同じ細胞でも至適培地の条件が異なるので、各検査室にて詳細は検討することが望ましい。

- 1) 8%牛血清 (BS) を添加した Eagle's MEM に浮遊させた RK13 細胞 (3×10^5 cells/ml) をプラスチックフラスコ (12.5cm²) に一本あたり 4ml、もしくは 6 穴プレート一穴当たり 3mL を播種し、37°C の炭酸ガス培養器で 2 日間培養する。
- 2) 0.2ml の検体を接種する。室温で 1 時間吸着した後、接種材料をのぞかずに 2%BS を含む培養液を 4ml 加え 35~37°C の炭酸ガス培養器で培養する (35°C の方が望ましいが 37°C でも分離可能である)。検体が尿の場合は接種材料を除いた後に培地を加える (尿は細胞への毒性が強い)。翌日に細胞変性効果 (CPE) がみられた場合はサンプルの非特異的な毒性によると考えられるので新しい培養液に交換する。接種後 4 日目に培養液を交換し、接種後 7 日目まで培養を続ける。通常この段階ではウイルスによる CPE はみられない。
- 3) 感染細胞を培養液とともに凍結融解し、その一部 (1ml) を新しい細胞に接種し、同様に培養する。通常この継代培養を 3 回繰り返すが、CPE が観察できるようになれば回数を減らすことができる。培養終了後細胞を凍結融解し、その後 3000rpm、20 分の遠心上清を分離試料としウイルス同定を行う。一般に風疹ウイルスによる CPE は弱いため CPE が観察できなくとも分離試料中に風疹ウイルスが存在している可能性が十分にある。また風疹ウイルスによる CPE は特徴がないので CPE 観察による分離同定の判定は事実上困難である。

4-3. 同定方法

風疹ウイルスの同定にはウイルス遺伝子検出 (RT-PCR)、蛍光抗体法によるウイルス抗原検出、抗血清による中和法等があるが、中和法は時間がかかることや中和抗体の確保など手間がかかるため推奨しない。本マニュアルでは遺伝子検出法 (既述) および蛍光抗体法による抗原検出法を記載する。なお、判定までの時間が短く、分子疫学的な解析も可能となるウイルス遺伝子検出を第一選択として使用することが推奨される。

4-3-1. 蛍光抗体法

使用細胞・試薬等はウイルス分離と同様のものを使用するが、細胞の培養はガラス製チャンバースライド (8 チャンバー) 等で行う。

- 1) RK-13 細胞をチャンバースライドで培養し、分離試料 25 μ l を接種し 35~37°C で 1 時間放置後、培養液を 0.4ml 加え 35~37°C の炭酸ガス培養器内で培養する
- 2) 感染後 CPE が現れたら (約 3-4 日、CPE が認められない場合でも 5-7 日目)、細胞を PBS で洗浄した後、4%パラホルムアルデヒドで 30 分間固定する。PBS で洗浄後、0.5%TritonX-100 加 PBS を室温 15 分で感作し、膜透過処理をする。
- 3) 固定した細胞に一次抗体として市販されている抗風疹ウイルス精製マウスモノクローナル抗体 (例 : abcam ab34749, USBiological R9700-05A) を 1~2 μ g/mL に希釈し、一区画あたり 100~200 μ l 加え、保湿箱に入れ 37°C 1 時間処理する。
- 4) PBS で 5-6 回洗浄後、FITC 標識抗マウス IgG 抗体 (濃度にもよるが 1 : 300~500 希釈) を 100~200 μ l のせ保湿箱に入れ 37°C 1 時間反応させる
- 5) PBS で 5-6 回洗浄後、蛍光観察用封入剤をのせてカバーガラスをおき、蛍光顕微鏡で観察する。同様に処理した非感染細胞を対照とし、風疹ウイルスに特異的な蛍光が検出される場合を風疹ウイルス陽性と判定する。

5. 検出ウイルスの命名法

WHO によって、風疹ウイルス野外株の命名方法が以下の通りに示されている⁸⁾。2013 年の改訂で年週の情報記載等が一部変更された。

1)臨床材料から細胞培養により分離されたウイルス株

RVi/City.Country/Weeks.Year/isolation number[Genotype]

2)臨床材料由来 RNA から遺伝子が検出されたウイルス株

RVs/City.Country/Weeks.Year/isolation number[Genotype]

City：臨床検体の得られた都道府県名または政令指定都市名。政令指定都市名の場合は C(city) をつける。

Country：臨床検体の得られた国名の略称（日本の場合 JPN）

Weeks.Year：発症週（疫学週）および発症年を記載する。風疹の場合、発疹と発熱はほぼ同時に出現するが、いずれかの症状しか認められない場合や不顕性の場合がある。また、発症日または症状の種類情報が得られないことがある。そのため、発症週／年としては以下の順に優先度の高い日時を起点として記載する。

①発疹出現日

②発疹が認められない場合もしくは症状の種類情報が得られない場合、なんらかの発症の出現日

③発症日の情報が得られない場合、検体採取日。

なお、年情報は、西暦の下二桁のみを記載する。

Isolation number：患者の発生した都市および発症週が同一のウイルス株が複数存在する場合、1 から順に整理番号を記載（オプション）

Genotype：遺伝子型

先天性風疹症候群（CRS）患者、先天性風疹感染（CRI）者の臨床材料から得られたウイルス株には[Genotype]の後ろにそれぞれ(CRS)、(CRI)と記載する。両者とも City, Country には出生地、Weeks, Year には出生日（検体採取日ではなく）を適用する。

ワクチン株には[Genotype]の後ろに(VAC)と記載する。

例（実在するものではありません）

（例1）1998年3週目に東京都で発症した患者から得られたウイルス株で、同一週の患者のうち2番目に解析されたもの。ウイルスが分離されており、

遺伝子型は 1D。

RVi/Tokyo.JPN/03.98/2[1D]

(例 2) 2009 年 28 週目に福岡市で出生した CRS 患者由来のウイルス。ウイルス遺伝子が検出されており、遺伝子型は 1B。

RVs/FukuokaC.JPN/28.09/[1B](CRS)

6. 血清学的検査

6-1. 赤血球凝集抑制(Hemagglutination Inhibition: HI)抗体測定法¹⁰⁻¹²⁾

6-1-1. 試薬類

下記に調製方法を示す。いずれも市販品があれば代替できる。

1) カオリン処理用試薬

1. PBS(-) (Dulbecco の PBS) pH7.2~7.4

NaCl 8.0g, KCl 0.2g, Na₂HPO₄ 1.15g, KH₂PO₄ 0.2g を蒸留水に溶解し全量を 1,000ml とする。

2. 25%カオリン懸濁液

デンカ株式会社 (カタログ番号 340047) 等から購入可能。自家作製する場合は以下の通り行う。カオリン (Fisher または Aldrich 製) 25g に PBS(-) 100ml を加えて作製する。カオリンは PBS(-) で 3 回洗う。上清の pH が 7 以上であることを確認したら、液面の高さを攪拌前につけた印にあわせる。

2) 赤血球用試薬

1. DGV (Dextrose-Gelatin-Veronal)

デンカ株式会社 (カタログ番号 340023) 等から購入可能。以下の通り自家調製可能であるが、高濃度ベロナール (バルビタール) を使用するため、向精神薬試験研究施設としての登録が必要となる (DGV 中のベロナールは低濃度のため、DGV の購入および使用には上記登録は不要である)。

NaCl 8.0g、ベロナール 0.575g、ベロナール-Na 0.375g、CaCl₂ 0.02g、MgSO₄ · 7H₂O、ゼラチン 0.6g、ブドウ糖 10g を蒸留水に溶解し、全量を 1,000ml とする。

2. ガチョウ赤血球浮遊液

ガチョウ赤血球は市販されている。それを DGV で 3 回洗ったあと、DGV で 8% 浮遊液を作製し、4℃ に保存する。採血後 3~4 週間保存できる。50% 浮遊液は使用直前に、8% 浮遊液を 1500rpm 10 分間遠心し上清を捨てた後、等量の DGV を加え作製する。HI 試験では後述の希釈液 2 で 0.25% 浮遊液を作り使用する。

3) 各種希釈液

1. PBS pH 6.8

NaCl 9.0g、Na₂HPO₄ 0.67g、KH₂PO₄ 0.72g、NaN₃ 1.0g を蒸留水に溶解し全量を 1,000ml とする。

2. カルシウムマグネシウム液

CaCl₂ 4.0g、MgCl₂ · 6H₂O 4.0g を蒸留水に溶解し 100ml とする

3. 1%ゼラチン

ゼラチン 1.0g に蒸留水 100ml を加え 115°C 10 分高压滅菌する。小分分注し、4°C にて保存。使用時に温浴でとくす。

4. 希釈液 1 (抗原および血清希釈液)

PBS pH6.8 200ml に牛血清アルブミン 0.2g、1%ゼラチン 1.0ml を加えたものを使用する。

5. 希釈液 2 (赤血球浮遊液作製用希釈液)

希釈液 1 200ml に 2 のカルシウムマグネシウム液 2 ml を加える。

4) HA (赤血球凝集素 ; Hemagglutinin) 抗原

HA 抗原は凍結乾燥されたものが市販されている(デンカ株式会社等)。

6-1-2. 血清処理

血清中には HA 反応を抑制する非特異的インヒビターが存在するので、予めカオリン処理によってこれを取り除く。また赤血球に対する自然凝集素は、大量の赤血球で吸収する。非働化された血清では、インヒビターが除けない場合もあるので、非働化した血清は用いない。抗体陽性と陰性の参考血清も同時に処理する。血清処理は以下に示すマイクロプレートまたはマイクロチューブで行う。

1) マイクロプレート法

- i) 平底マイクロプレートの穴を一つおきに使う。被検血清各 25 μ l を入れる(図 6)。
- ii) 25%カオリン 0.1ml ずつを血清の入っている穴に入れる。カオリンが不均一にならないように、時々カオリン液を再浮遊させ素早く分注する。
- iii) プレート上面の水分を拭き取ってからシールする。
- iv) プレートを手で激しく振る。室温に 20 分放置する。
- v) プレートを振った後、プレート遠心機で 1500rpm、3 分間遠心する。

- vi) 遠心後はプレートを水平に保持しシール穴側面を濡らさないようにし、シールをはがす。
- vii) 各穴に 8%赤血球浮遊液を $50\mu\text{l}$ および PBS(-)を $25\mu\text{l}$ 加える
- viii) 再びシールをし、プレートを軽く振って赤血球をよく混和させる。
- ix) プレートを 4°C に 1 時間から 1 夜おく。この間 2 度プレートを振って赤血球を再浮遊させる。
- x) プレートを遠心 (1500rpm 、3 分間) してからシールをはがす。この上清が処理済み 1:8 希釈血清となる。

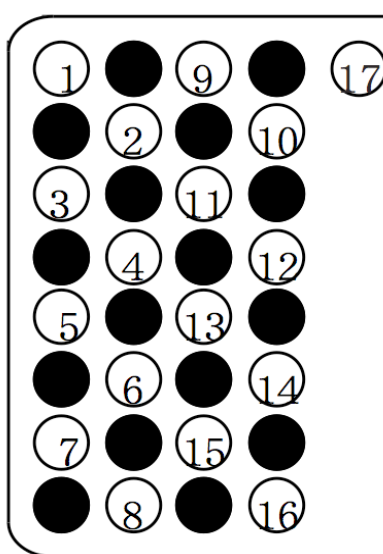


図6 マイクロプレートでの血清のカオリン処理
平底マイクロプレートの穴を1つおきに使う。

2) マイクロチューブ法

- i) 血清 $50\mu\text{l}$ を 1.5ml のマイクロチューブにとる
- ii) PBS (-) を $150\mu\text{l}$ 加える
- iii) 25%カオリン液を $200\mu\text{l}$ 加え、激しく振る。室温 20 分放置、その間に 2、3 回震盪する
- iv) 2000rpm 20 分遠心後、上清を別のマイクロチューブに移す。
- v) 50%赤血球浮遊液を $12.5\mu\text{l}$ 加え、氷浴に 1 時間おく又は 4°C 1 夜放置する。この間、時々チューブを振って血球を再浮遊させる。
- vi) 2000rpm 、20 分 4°C で遠心後、上清を回収する。これを 1:8 希釈血清とする。

6-1-3. HA 抗原の定量

HI 試験を実施する前に、使用する HA 抗原の力価を測定しなくてはならない。

- 1) 希釈液 1 を用いて HA 原液を 1:2 に希釈し、その 50 μ l を 96 穴 U 底マイクロプレートの穴 No.1 (横長においた場合の最も左端の列) にとる。同じものを 2 列つくり、HA 希釈を 2 列同時に行うようにする。また必要 (より詳細に HA 定量を実施したい場合に) に応じて原液を 1:3 および 1:10 に希釈したのも 2 列同時に希釈する。
- 2) 希釈液 1 を No.2 から 12 まで 25 μ l ずつ加える
- 3) 2 倍階段希釈を No.11 の列まで行う (No.12 の列は血球対照として使用)
- 4) 希釈液 1 を各穴に 25 μ l ずつ加える
- 5) 各穴に 0.25%赤血球浮遊液を 50 μ l 加える
- 6) プレートをすぐにマイクロプレートミキサーなどを用い、よく混和させる (5 秒ずつ 3 回)。血球の混和が十分でないと不完全凝集が続き HA の定量が正確に行えなくなる場合がある。
- 7) プレートを冷蔵庫 (4-10°C) に 1 時間置く
- 8) プレートを室温にだして 5-10 分後にプレートを観察し結果を判定する。完全または部分凝集した終末の希釈倍数を、その HA 原液の HA 価とする。この値を T とすると、HA 原液を T/4 倍に希釈液 1 で希釈した液 (4 単位 HA の力価に相当) を HI 試験に使用する抗原とする。例えば原液の HA 価が 32 の場合には原液を 8 倍希釈したものを HI 試験に使用する。

6-1-4. HI 本試験

U 底マイクロプレートの穴を図 7 のように振り分ける。

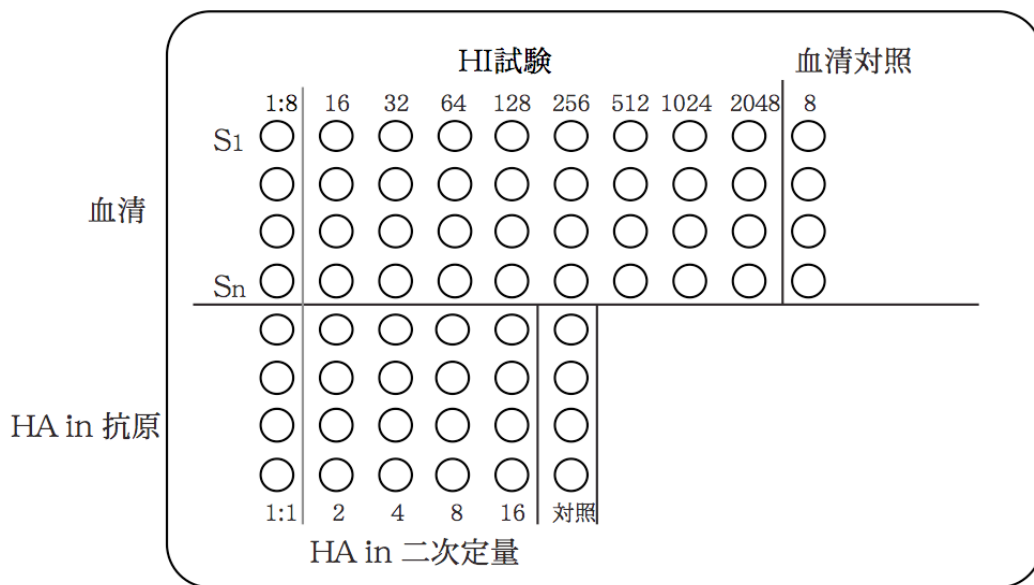


図7 検体および対照のマイクロプレート上でのレイアウト例

- 1) 処理済み血清を<HI 試験>の 1:8 の穴に 50 μ l、<血清対照>の 1:8 の穴に 25 μ l とる。他の穴には希釈液 1 を 25 μ l ずつ入れる。
- 2) 2 倍階段希釈を行う
- 3) <HI 試験>の穴に調製した HA 抗原 25 μ l ずつを、<血清対照>の穴に希釈液 1 を 25 μ l ずつ加える。マイクロミキサー等で混和後、室温に 1 時間放置する。
- 4) HA 抗原の 2 次定量を行う。<HA 二次定量>の 1:1 希釈の穴に<HI 試験>の穴に加えたのと同じ抗原を 50 μ l 入れる。後は先に述べた HA 試験の要領で 2 倍階段希釈実施後、希釈液 1 を 25 μ l 加える。
- 5) 0.25%赤血球浮遊液 50 μ l ずつをすべての穴に加え十分に混和する。
- 6) プレートを冷蔵庫 (4-10 $^{\circ}$ C) に 1 時間置く。
- 7) <HA 二次定量>で HA 価が 4 単位であることを確かめる。抗体陽性および陰性対照を設定している場合は、対照血清の HI 価が正しくでているかを確認する。以上が満たされた場合、試験成立とする。<血清対照>において自然凝集素が存在する検体は、血清処理を再度実施し、再検査する。
- 8) HA 反応を完全阻止した最終希釈倍数を、その血清の HI 抗体価として判定する。

6-1-5. 一般的な注意

HI 抗体測定に必要な試薬がセットになっている検査試薬も販売されており使用が可能である（デンカ株式会社：風疹ウイルス HI 試薬「生研」、R-HI「生研」）。このような検査キットを使用する場合にはキットの使用説明書に従い操作判定を行う必要がある。

6-1-6. 評価の目安

HI 試験では、風疹特異的 IgM, IgG および IgA のいずれも反応し、総合的な抗体価として測定されることから、結果の解釈には十分な理解が必要である。IgG が測定されることから、感染の診断目的の使用にはペア血清を用いる必要がある。急性期および回復期の 2 点の血清を測定し、陽転あるいは 4 倍以上の抗体価の上昇が認められれば、風疹ウイルスの感染があったと判断できる²⁾。一方で、HI 試験では IgM も検出することから、高い HI 抗体価は直近の風疹感染を反映しうる可能性があり、その判定には臨床症状等を含め十分な検討が必要である。顕性感染の場合、一般に発疹が出現してから 4 日後には HI 抗体の上昇が見られ、発疹出現後 1-2 週で最高価（1:256 から 1:8192 程度）に達する。7 ヶ月から 3 年後くらいまでは、128 倍程度の抗体価で安定する。512 倍以上の抗体価が発疹出現後 7 ヶ月以上持続することはないと考えられている。従って 512 倍以上の抗体価の場合は、初感染後 7 ヶ月以内か、再感染によるブースターである可能性が高い。

6-2. IgM 酵素免疫抗体測定 (IgM-EIA)

間接法ならびに IgM 抗体捕捉法による EIA キットとの 2 種類があり市販されている。いずれのキットも使用説明書の記載に従って操作し判定する。

6-2-1. 評価の目安

キットの判定基準に基づき判定を行う。初感染の場合、風疹ウイルス特異的 IgM は発疹出現後数日で検出され始め、発症 2 週間後程度でピークに達し、発症 2 ヶ月後までに検出されなくなるとされる。発疹出現 3 日までは、十分に IgM が産生されず、約半数で検出されないことに注意が必要である。持続期間については個人差が大きく、長期にわたって持続陽性を示すケースもある（弱陽性のことが多い）。また、他の感染症によって非特異的に弱陽性となることもある。

再感染の場合でも症例の約 50%に IgM 抗体が検出されるので、IgM 抗体の有無だけでは初感染との判別は困難である。一般に再感染例では、持続期間が短く抗体価も低い。

6-3. IgG 酵素免疫抗体測定 (IgG-EIA)

間接法の EIA キットが市販されている。いずれのキットも使用説明書の記載に従い操作し判定する。

6-3-1. 評価の目安

急性期および回復期のペア血清の抗体価を同時に測定し、抗体の陽転あるいは、2倍以上の上昇があった場合⁵⁾、風疹ウイルス感染があったと判定できる。

7. 引用文献

- 1) 風しんに関する特定感染症予防指針、平成 26 年 3 月 28 日、平成 29 年 12 月 21 日一部改定
- 2) 平原史樹ほか：風疹流行および先天性風疹症候群の発生抑制に関する緊急提言。厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業分担研究班 風疹流行にともなう母子感染の予防対策構築に関する研究、2004.
- 3) World Health Organization: Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection. Second edition. WHO/IVB/07.01. 2007.
- 4) 麻疹診断マニュアル（第 4.0 版）、令和 4 年.
- 5) 国立感染症研究所ウイルス第三部／感染症疫学センター：風しん抗体価の換算（読み替え）に関する検討、国立感染症研究所ホームページ、2014 年 6 月改訂版
- 6) World Health Organization: Standardization of the nomenclature for genetic characteristics of wild-type rubella viruses. Wkly. Epidemiol. Rec., 80(14), 126-132, 2005.
- 7) Yasui et al.: Detection and genotyping of rubella virus from exanthematous patients suspected of having measles using reverse transcription-PCR. Jpn. J. Infect. Dis., 67, 389-391, 2014.
- 8) World Health Organization: Rubella virus nomenclature update: 2013. Wkly. Epidemiol. Rec., 88(32), 337-348, 2013.
- 9) Umino, Y and Tashiro, M.: Inhibition of rubella virus growth by Fungizone. Vaccine, 19, 1369-1372, 2001.
- 10) 加藤茂孝：風疹 HI 抗体価測定の術式。臨床とウイルス、19(2)、127-130、1991.
- 11) 加藤茂孝：血清処理用カオリンの酸処理は必要条件ではない。臨床とウイルス、22(2)、S75、1994.
- 12) Inouye, S.: Micro-modification of kaolin treatment of serum for the rubella hemagglutination-inhibition test. J. Med. Microbiol., 9, 501-502, 1976.

8. 検査依頼先

- ・ 全国都道府県/政令市衛生研究所
- ・ 国立感染症研究所ウイルス第三部
〒208-0011東京都武蔵村山市学園 4-7-1
Tel:042-561-0771
Fax:042-565-3315

9. 改訂履歴

第一版：平成 14 年 3 月

第二版：平成 24 年 12 月

第三版：平成 27 年 3 月

第 3.1 版：平成 27 年 8 月

第 3.2 版：平成 29 年 8 月：リアルタイム RT-PCR 試験最適化における参照 RNA 希釈段階の変更

第 4.0 版：令和元年 7 月：参照 RNA の変更。コンベンショナル RT-nested PCR 法 [非構造蛋白質 (NS) 遺伝子増幅法] の実施例の整理、風疹ウイルス E1 遺伝子の検出および遺伝子解析の実施例の変更、シーケンシング用プライマーの追加、シーケンス反応産物の精製方法の記載変更

第 5.0 版：令和 4 年 10 月：血清学的検査の記載位置の変更、麻疹風疹マルチプレックス Real-time RT-PCR 法に関する記載（別途記載であること）、遺伝子検査用風疹参照 RNA の調製方法の追記、E1 遺伝子増幅ならびに解析法の変法記載（M13 配列付加プライマーの使用）

10. 執筆者

（第 4.0 版）

森 嘉生、坂田真史、中津祐一郎、竹田誠：国立感染症研究所ウイルス第三部
安井善宏、皆川洋子：愛知県衛生研究所
倉田貴子、上林大起：大阪健康安全基盤研究所

第 4.0 版作成にご協力いただきました以下の皆さまに感謝申し上げます。

麻疹・風疹リファレンスセンター

長野秀樹、三好正浩、池田辰也、小川知子、西嶋陽奈、七種美和子、板持雅恵、大友麗、梶原淳睦、大山み乃り

山口県環境保健センター 村田祥子

(第 5.0 版)

森 嘉生、坂田真史、中津祐一郎、竹田誠：国立感染症研究所ウイルス第三部
岡本貴世子：国立感染症研究所 危機管理研究センター

麻疹・風疹リファレンスセンター

北海道立衛生研究所 駒込理佳、三好正浩

山形県衛生研究所 駒林賢一、青木洋子

千葉県衛生研究所 佐藤重紀

神奈川県衛生研究所 鈴木理恵子

愛知県衛生研究所 齋藤典子、諏訪優希、皆川洋子

富山県衛生研究所 板持雅恵

大阪健康安全基盤研究所 改田祐子、上林大起、倉田貴子

鳥取県衛生環境研究所 大友麗、上田豊

福岡県保健環境研究所 芦塚由紀、濱崎光弘

沖縄県衛生環境研究所 眞榮城徳之

11. 附属資料

S3-2. コンベンショナルRT-nested PCR法[非構造蛋白質(NS)遺伝子増幅法]の別例(Two-Step法(PerfectShot Ex-Taq試薬使用)ならびにOne-Step法)を示す。

S3-2-1. Two-step 法による風疹ウイルス NS 遺伝子の検出(PerfectShot Ex-Taq 使用例)

S3-2-1-1. 試薬

- PCR 酵素 [PerfectShot Ex-taq (Loading dye mix) ; タカラバイオ社]
その他の試薬は、本文 3-2-1-1.試薬に準じる。

S3-2-1-2. ウイルス RNA 抽出

RNA 抽出はリアルタイム RT-PCR 法と同様に行う (本文 3-1-3-1 ウイルス RNA 抽出に準じる)。

S3-2-1-3. 逆転写反応(RT)

RNA 抽出は本文 3-2-1-3 逆転写反応(RT)に準じる。

S3-2-1-4. 1st PCR および nested PCR 反応

<PerfectShot Ex Taq (Loading dye mix)使用例>

1) 以下の試薬およびプライマーセットを混合し、PCR 反応を行う。

PerfectShot Ex-Taq	25 μ L
cDNA	5 μ L
Forward primer: NSL F3 (20 μ M)	1 μ L
Reverse primer: NSL B3-6 (20 μ M)	1 μ L
DNase/RNase free water	18 μ L
合計	50 μ L

反応	条件	サイクル数
1. Denaturation	94 $^{\circ}$ C 3分	1
2. PCR 反応	Denaturation	98 $^{\circ}$ C 10秒
		30

	Annealing	58°C 30 秒	
	Extension	72°C 45 秒	
3. 最終 Extension		72°C 3 分	1

2) 以下の試薬を混合し、nested PCR 反応を行う。

PerfectShot Ex-Taq	25μL
1st PCR 産物	5μL
Forward primer: F2 nest (20μM)	1μL
Reverse primer: B2 nest (20μM)	1μL
DNase/RNase free water	18μL
合計	50μL

反応	条件	サイクル数
1. Denaturation	94°C 3 分	1
2. PCR 反応	Denaturation	30
	Annealing	
	Extension	
3. 最終 Extension	72°C 3 分	1

3) 電気泳動

1.5~2.0%アガロースゲル (TAE buffer 使用) を用い、Mupid ミニゲル泳動槽等で 10μL の PCR 産物を泳動する。DNA 検出用蛍光試薬による染色後、トランスイルミネーターで蛍光検出する。風疹ウイルス遺伝子が存在した場合、1st PCR の増幅産物として 256bp、nested PCR の増幅産物として 157bp のバンドが認められる。

S3-2-2. One-step RT-PCR 法による風疹ウイルス NS 遺伝子の検出

NS 遺伝子の検出には One-Step 法を用いた変法を用いることができる。検体には本文<4-2-1-2>に準じて抽出した RNA を用いる。

S3-2-2-1 試薬

- RT-PCR 酵素 [例: QIAGEN OneStep RT-PCR kit; QIAGEN 社製]
- RNase Inhibitor [例: Recombinant RNase Inhibitor; タカラバイオ社]
- PCR 酵素 [例: Takara Ex-taq; タカラバイオ社]
- NS 遺伝子増幅用プライマー: 本文 4-2-1-1 で示したもの

S3-2-2-2 One-step RT-PCR および Nested PCR 反応

以下の試薬およびプライマーセットを混合し、RT-PCR 反応を行う。

RNase-Free dH ₂ O	6.25 μl
5×Qiagen OneStep RT-PCR buffer	5 μl
5×Q Solution	5 μl
dNTP Mix	1 μl
Forward Primer NSL F3 (20 μM)	0.75 μl
Reverse Primer NSL B3-6 (20 μM)	0.75 μl
Qiagen One Step Enzyme Mix	1 μl
RNase Inhibitor (40U/μL)	0.25 μl
鋳型 RNA	5 μl
Total Volume	25μL

反応	条件	サイクル数
1. 逆転写反応	50°C 30 分	1
2. 逆転写酵素不活化	95°C 15 分	1
2. PCR 反応	Denaturation	94°C 30 秒
	Annealing	58°C 30 秒
	Extension	72°C 1 分
3. 最終 Extension	72°C 10 分	1

以下の試薬およびプライマーセットを混合し、nested PCR 反応を行う。

dH ₂ O	18.875 μ l
10 \times Ex Taq buffer	2.5 μ l
dNTP Mixture (2.5mM each)	2 μ l
Forward Primer F2 nest (20 μ M)	0.5 μ l
Reverse Primer B2 nest (20 μ M)	0.5 μ l
Ex Taq (5U/ μ L)	0.125 μ l
RT-PCR 産物	0.5 μ l
Total Volume	25 μ L

反応	条件	サイクル数
1. Denaturation	94°C 3分	1
2. PCR 反応	Denaturation	25
	Annealing	
	Extension	

S3-3. M13配列付加プライマーを用いた風疹ウイルスE1遺伝子の検出および遺伝子解析

E1遺伝子増幅法で用いるNested PCR／シーケンスプライマーのうち、一部のプライマー（E1-10R、E1-3FおよびE1-3R）の代わりに、これらの3'末端に各種M13プライマー配列を付加したプライマーを用いてNested PCRを行う。サイクルシーケンス反応では、E1-10R、E1-3FおよびE1-3Rの代わりに、付加した配列に対応する各種M13プライマーを用いる。これにより、シーケンス反応の波形の改善と反応開始直後の波形解読が期待される。

S3-3-1. 試薬

プライマー以外の試薬は、本文<3-3-1. 試薬>を参照のこと。

● E1 遺伝子増幅用プライマー

5'断片 E1-(2)

用途	プライマー名	認識領域 (bp)	配列
1st PCR	E1-2F	8633-8652	AGC GAC GCG GCC TGC TGG GG
	E1-2R*1	9119-9138	CCA GCG CGT ATG TGG AGT CC
Nested PCR	E1-6F	8664-8683	ACA CCG TGA TGA GCG TGT TC
	E1-10Rm*2	9110-9129	CAG GAA ACA GCT ATG ACA TGT GGA GTC CGC ACT TGC G
シーケ ンシング	E1-6F	8664-8683	ACA CCG TGA TGA GCG TGT TC
	M13 reverse*2	NA	CAG GAA ACA GCT ATG AC

*1: E1-2R の代わりに E1-2Rmix が使用可能である ㊦。

E1-2Rmix: CCR GCG CGT ATG TGG AGY CC

(混合塩基 R: A/G, Y: T/C)

*2: <3-3>で記載の従来法と異なるプライマー

3'断片 E1-(3)

用途	プライマー名	認識領域 (bp)	配列
1st PCR	E1-7F	8991-9010	TTG TGG GGG CCA CGC CAG AG
	E1-12R	9521-9540	TGT GTG CCA TAC ACC ACG CC

Nested PCR	E1-3Fm*1	9070-9089	TGT AAA ACG ACG GCC AGT CGG CGA GGT GTG GGT CAC GC
	E1-3Rm*1	9473-9492	CAG GAA ACA GCT ATG ACA CCC GCG CGC TCG CGC GAT C
シークエ ンシング	M13 forward*1	NA	TGT AAA ACG ACG GCC AGT
	M13 reverse*1	NA	CAG GAA ACA GCT ATG AC

*1: <3-3>で記載の従来法と異なるプライマー

S3-3-1. 1st PCR および nested PCR

1st PCR は、本文<3-3-2. 1st PCR および nested PCR>の通り、実施する。

<nested PCR>

1) 以下の試薬を混合し、nested PCR 反応を行う。

2×Tks Gflex buffer (Mg ²⁺ , dNTP plus)	12.5μL
1st PCR 産物	2.5μL
5'断片 E1-(2) 3'断片 E1-(3)	
Forward primer (20μM) E1-6F E1-3Fm	0.25μL
Reverse primer (20μM) E1-10Rm E1-3Rm	0.25μL
Tks Gflex DNA polymerase (1.25 units/μL)	0.5μL
DNase/RNase free water	9μL
合計	25μL

反応	条件	サイクル数
1. Denaturation	98°C 1分	1
2. PCR 反応	Denaturation	98°C 10秒
	Annealing	E1-(2): 59°C 15秒 E1-(3): 66°C 15秒
	Extension	68°C 30秒
3. 最終 Extension	72°C 5分	1

2) 電気泳動

本文<3-3-2. 1st PCR および nested PCR>に準じて実施する。nested PCR の増

幅産物は 5'断片 E1-(2)で 483bp, 3'断片 E1-(3)で 458bp とのバンドとして認められる。

S3-3-3. PCR 産物の精製とダイレクトシーケンス反応

1) PCR 産物の精製

本文<3-3-3. PCR 産物の精製とダイレクトシーケンス反応>に準じて実施する。

2) シーケンス反応

以下の試薬およびプライマーを混合し、サイクルシーケンス反応を行う。

H ₂ O	10μL
Primer (3.2μM)*	1μL
BigDye Terminator Ready Reaction Mix	8μL**
精製 PCR 産物 (5-20ng/μL)	1μL

*Primer: 5'断片 E1-(2)の場合、E1-6F または M13 reverse、3'断片 E1-(3)の場合、M13 forward または M13 reverse を用いる。

**BigDye Terminator Ready Reaction Mix は 5×BigDye sequencing buffer で希釈可能であるが、至適希釈率は各自で検討を行う必要がある。

反応条件	サイクル数
96°C 1分	1
96°C 10秒	25
50°C 5秒	
60°C 4分	

3) シーケンス反応産物精製およびシーケンス解析

本文<3-3-3. PCR 産物の精製とダイレクトシーケンス反応>に準じて実施する。

S3-3-4. シーケンス結果の解析

本文<3-3-4. シーケンス結果の解析>に準じて実施する。参考のため、プライマー認識部位を図 8 に示す。



図8. M13配列付加2nd PCRプライマーの認識部位

M13配列付加2nd PCRプライマーE1-10Rm、E1-3Fm、E1-3Rmの配列と認識部位を示す。遺伝子型決定領域を黒字で、その他の領域は灰色で示す。